



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/55, 15/11, 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/50568</b> <b>(43) Date de publication internationale: 12 novembre 1998 (12.11.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/00928 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 7 mai 1998 (07.05.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/05652 7 mai 1997 (07.05.97) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> HÖFTE, Herman [NL/FR]; 12, rue Marceau, F-78210 Saint-Cyr-l'Ecole (FR). NICOL, Frédéric [FR/FR]; 13, rue des Bourdonnais, F-78000 Versailles (FR). <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title: CELL GROWTH CONTROL IN A PLANT USING AN ENDO-1,4-β-D-GLUCANASE GENE</b>		
<b>(54) Titre: CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE CHEZ UNE PLANTE PAR L'UTILISATION D'UN GENE D'ENDO-1,4-β-D-GLUCANASE</b>		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention concerns the use of a nucleotide sequence coding for an endo-1,4-β-D-glucanase to inhibit cell growth in a plant. Said nucleotide sequence corresponds wholly or partially to the <i>Arabidopsis</i> KOR protein sequence (SEQ ID N° 2) or a protein sequence the N-terminal end of which has at least 40 % and preferably 70 % identity with the first 107 amino acids of said KOR.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>L'invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique codant pour une endo-1,4-β-D-glucanase pour inhiber la croissance cellulaire chez une plante. La séquence nucléotidique en question correspond en tout ou partie à la séquence protéique de la KOR d'<i>Arabidopsis</i> (SEQ ID N° 2) ou à une séquence protéique dont l'extrémité N-terminale présente au moins 40 % et de préférence 70 % d'identité avec les 107 premiers acides aminés de la susdite KOR.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE CHEZ UNE PLANTE PAR  
L'UTILISATION D'UN GENE D'ENDO-1,4- $\beta$ -D-GLUCANASE

L'invention concerne le contrôle de la croissance cellulaire chez une plante par l'utilisation d'un gène codant pour une endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase.

5 L'architecture des plantes est en grande partie déterminée par des événements d'élongations cellulaires contrôlés. La paroi cellulaire primaire est un réseau de polysaccharides et de protéines hautement dynamiques qui jouent un rôle central dans le contrôle de l'élongation cellulaire (Carpita, 1993). La structure de la paroi cellulaire est formée de microfibrilles de cellulose auxquelles sont étroitement associés des polymères  
10 comme les xyloglucanes. Chez les dicotylédones, les xyloglucanes forment la structure porteur entre les microfibrilles et ainsi jouent un rôle crucial dans les possibilités d'extension de la paroi. Une activité enzymatique impliquée dans le relâchement de la tension de la paroi a été identifiée dans des tests d'extensibilité de la paroi *in vitro*. Les protéines correspondantes sont appelées des expansines (Cosgrove, 1996) et semblent  
15 contrôler la liaison hydrogène entre les microfibrilles et les xyloglucanes. D'autres activités enzymatiques potentiellement impliquées dans l'extension de la paroi ont été identifiées au sein de celle-ci, par exemple les XETs (Desilva, 1994) et les endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases.

Des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ont été identifiées dans des bactéries et des plantes  
20 (Brummel et al., 1994), et dans les plantes elles sont principalement représentées par de grandes familles de gènes, comptant par exemple chez *Arabidopsis* au moins 5 membres et chez la tomate au moins 6 membres. Cette enzyme semble jouer un rôle dans le processus de la dégradation de la paroi cellulaire intervenant par exemple durant la maturation du fruit et l'abscission des feuilles (Del Campillo et al., 1996). Des isoformes  
25 d'endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase avec des schémas d'expression compatibles avec ces activités, ont été identifiées dans la tomate (Del Campillo et al., 1996 ; Gonzales-Bosch et al., 1996), dans l'avocat (Cass et al., 1990) et dans le poivre (Ferrarese et al., 1995). Par ailleurs, il a été décrit que le ramollissement des fruits et la dégradation polysaccharidique de la paroi cellulaire pouvaient être réduits par l'inhibition de  
30 l'activité endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase au moyen de constructions d'ADN anti-sens (WO91/16426, WO96/01555).

Un rôle des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases a également été suggéré dans le contrôle de l'élongation cellulaire, basé sur des schémas d'expression (Fry, 1989 ; Fry 19952). Enfin, il a été avancé le fait que les endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases pouvaient avoir un rôle dans la croissance cellulaire (Inouhe et al., 1991) par l'inhibition de la croissance induite  
5 par les auxines sur des sections d'hypocotyles de coléoptiles de maïs par l'application d'anticorps dirigés contre des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases.

Cependant, aucune relation directe n'a été établie *in vivo* quant au rôle que pouvait avoir une endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase dans le contrôle de la croissance cellulaire chez les plantes. Par exemple, la réduction chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) du  
10 niveau d'expression du gène *CEL1* codant pour une endo- $\beta$ -1,4-glucanase par la stratégie anti-sens avait pour effet une réduction de l'abscission florale, sans affecter la maturation des fruits, ni la croissance cellulaire (Lashbrook et al., 1998). Or, ce contrôle chez les plantes cultivées revêt une importance économique certaine. Par exemple, la réduction de la longueur des tiges de certaines variétés de culture confère une protection contre la  
15 verse. Les dommages causés par la verse sont importants dans les espèces cultivées suivantes : le blé, l'orge, le sorgho, le maïs, le riz, les espèces de Brassica, les lentilles, le tabac, le soja, le mûrier et autres. La réduction de la longueur des tiges contribue également à une augmentation des rendements. Des gènes de nanisme dominants ou semi-dominants ont également été utilisés dans des programmes de reproduction pour un  
20 certain nombre d'espèces : le blé, le riz, le colza, le maïs etc.

Le contrôle de la taille cellulaire peut également avoir d'autres applications. Par exemple la taille des fruits est en grande partie le résultat de l'expansion cellulaire contrôlée. Egalement, les caractéristiques mécaniques des fibres végétales, telles que les fibres du coton ou le lin, sont en grande partie déterminées par leur longueur. Par  
25 exemple, la résistance mécanique du papier augmente avec l'augmentation de la longueur des fibres celluloses qui le constituent.

La présente invention concerne plus particulièrement un membre de la famille des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, appelée également KORRIGAN ou KOR, directement impliquée dans le phénomène d'élongation cellulaire. Elle se distingue des autres endo-  
30 1,4- $\beta$ -D-glucanases, comme par exemple la susdite *CEL1* chez la tomate, en ce sens que son inhibition spécifique permet l'obtention de résultats particulièrement intéressants en

terme de limitation de la croissance cellulaire chez les plantes sans réduire les phénomènes de la maturation des fruits ou de l'abscission des feuilles.

La KOR de la présente invention présente une séquence hautement conservée parmi les espèces de plantes notamment les dicotylédones tels que *Arabidopsis thaliana* et *Lycopersicon esculentum* et les monocotylédones tels que *Oryza sativa*.

SEQ ID n° 1 représente la séquence en ADNc du gène de la KOR chez *Arabidopsis*.

SEQ ID n° 2 représente la séquence protéique correspondante.

Ainsi, la présente invention a notamment pour objet l'utilisation d'une séquence nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'une endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase correspondant à la séquence protéique selon SEQ ID n° 2 ou un fragment de SEQ ID n° 2 pour inhiber totalement ou partiellement la croissance cellulaire chez une plante. En effet, l'un des buts de la présente invention est de bloquer l'expression de la séquence nucléotidique de la KOR afin de limiter le phénomène d'élongation cellulaire. La séquence à bloquer est donc une séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie de SEQ ID n° 2 compte tenu de la dégénérescence du code génétique, étant entendu que la séquence nucléotidique susceptible d'être utilisée dans le cadre de la présente invention peut être également constituée en partie de séquences nucléotidiques non codantes en amont et/ou en aval de la séquence nucléotidique correspondant à la susdite séquence protéique, y compris de séquences introniques.

La séquence nucléotidique utilisée dans le cadre de la présente invention peut également être au moins partiellement constituée d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide dont l'extrémité N-terminale présente au moins 40 % et de préférence au moins 70 % d'identité avec les 107 premiers acides aminés de SEQ ID n° 2. En effet, SEQ ID n° 2 correspond à la séquence protéique de la KOR chez *Arabidopsis* et il est à souligner que les KORs des autres plantes ont une séquence protéique présentant au moins 40 % et de préférence au moins 70 % d'identité avec celle des 107 premiers acides aminés de la KOR d'*Arabidopsis*, ce qui distingue la KOR et ses orthologues des autres membres de la famille des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases.

Il n'est donc pas nécessaire que la séquence nucléotidique utilisée dans le cadre de l'invention comprenne en tout ou partie une séquence identique ou fortement homologue aux 107 premiers acides aminés de la séquence de SEQ ID N° 2, il suffit que la séquence en question comprenne au moins 20 pb et dérive d'une séquence  
5 nucléotidique codant pour un polypeptide dont la partie N-terminale est identique ou fortement homologue aux 107 premiers acides aminés de SEQ ID N° 2.

Par l'expression "la séquence *dérive* d'une séquence nucléotidique", on entend que la première séquence constitue au moins une partie de la seconde séquence et peut se différencier de cette dernière notamment du fait de la dégénérescence du code génétique  
10 et/ou de mutations ponctuelles.

Plus particulièrement, la susdite séquence nucléotidique peut être utilisée dans une orientation anti-sens. Il s'agit en effet d'insérer dans une orientation anti-sens la séquence nucléotidique en question derrière un promoteur végétal dans un vecteur apte à transformer directement ou indirectement les cellules de plantes. La cellule végétale  
15 ainsi transformée voit l'expression de sa KOR bloquée par la séquence anti-sens correspondante insérée dans le génome. Le gène de la KOR ne pouvant donc s'exprimer, les phénomènes d'élongation cellulaires sont ainsi inhibés.

La séquence nucléotidique conforme à l'invention peut également être utilisée dans une orientation sens. La cellule végétale ainsi transformée voit l'expression de sa  
20 KOR bloquée par l'expression de la séquence sens correspondante insérée dans le génome, dû au phénomène de l'extinction de l'expression du gène endogène ou co-suppression ("gene silencing", Meyer et Saedler, 1996).

Il est rappelé que la transformation des cellules de plantes peut être soit directe, soit indirecte.

25 Ce que l'on appellera par la suite, transformation directe, est une transformation pour une cellule de plante réalisée directement par un vecteur selon des techniques connues de l'homme du métier telles qu'au moyen d'une micropipette pour assurer le transfert mécanique de l'ADN, à l'aide de polyéthylène glycol, par pénétration ballistique à haute vitesse au moyen de petites particules contenant soit à l'intérieur soit  
30 à leur surface l'acide nucléique à faire pénétrer dans la cellule de plante, par fusion de protoplastes avec d'autres entités, cellules, lysosomes ou autres corps de surfaces

lipidiques susceptibles de fusionner, ou par électroporation. La transformation de cellules de plantes peut également être réalisée par l'insertion de la séquence nucléique d'intérêt au sein d'un plasmide recombinant par exemple d'origine bactérienne dans lequel a été préalablement inséré le génome d'un ADN viral tel que celui du virus de la mosaïque du chou-fleur, le plasmide résultant étant utilisé pour transformer les cellules de plantes.

Ce que l'on appellera par la suite la transformation indirecte des cellules de plantes est également connue de l'homme de métier. Elle consiste par exemple à transformer un microorganisme tel qu'*Agrobacterium tumefaciens* au moyen de la susdite séquence nucléique ledit microorganisme étant ensuite utilisé pour transformer les cellules de plantes.

Avantageusement, au sein de l'un des susdits vecteurs, la séquence nucléotidique utilisée peut être précédée d'un promoteur spécifique de certains types cellulaires, tissus ou organes afin de limiter l'élongation de la plante aux seules parties visées sans affecter le reste de la plante.

L'invention concerne également un procédé de contrôle de la croissance cellulaire d'une plante comprenant une étape de transformation directe ou indirecte d'une cellule de plante au moyen d'un vecteur tel que ceux ci-dessus mentionnés. Plus particulièrement, le contrôle en question consiste en une inhibition partielle ou totale de ladite croissance cellulaire.

L'invention concerne également des cellules de plantes transformées susceptibles d'être obtenues ou non par le susdit procédé, les plantes comprenant les susdites cellules ainsi que les semences issues desdites plantes.

Les plantes plus particulièrement concernées par la présente invention sont les espèces des généra suivants : *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Fritolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Mnihat*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapsis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Licopersicon*, *Nicotinia*, *Solamum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hterocallis*, *Nemesia*, *Perlargonium*, *Panicum*, *Pennisctum*, *Rananculus*, *Senecia*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, *Malus*, *Apium*, *Eucalyptus*, *Populus* et *Datura*. Préférentiellement, les plantes sont *Brassica oleracea*, *Brassica napus* et le colza.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'expression de la séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus peut être mise en oeuvre à des fins de criblage de composés susceptibles d'agir sur l'élongation cellulaire des plantes en particulier en inactivant la KOR. Il s'agit en effet, selon des techniques connues de l'homme de métier, de faire exprimer une séquence nucléotidique de l'invention dans un vecteur d'expression comprenant les séquences nécessaires pour assurer l'initiation de la transcription dans des microorganismes, de mettre ceux-ci en culture et d'observer l'apparition d'un halo coloré attestant de l'expression de la KOR, par des techniques de coloration classiques. La mise en contact de ces microorganismes avec les composés à cribler permettra de mettre en évidence, avec l'observation de l'inhibition de la formation du susdit halo, les composés inhibant l'activité de la KOR.

En d'autres termes, la KOR produite par les techniques ci-dessus décrites pourra servir de cible dans des tests de recherche de molécules herbicides ou de régulateurs de croissance inhibiteurs de l'activité glucanase.

La figure 1 représente la phylogénie des sous-groupes de cellulases de plantes des endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases de type E2. Il apparaît sur cette figure que la séquence de KOR et celle de la tomate TOM15590 se distinguent des autres membres de la famille endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (pour les abréviations des enzymes, se rapporter au tableau 3 ci-dessous).

La figure 2 illustre une comparaison d'une partie de la séquence de la KOR (Korrigan) avec la séquence d'autres familles de cellulases de bactéries. Il est à noter que deux domaines d'acides aminés sont conservés parmi les 16 endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases de la famille E (pour les abréviations des enzymes, se reporter au tableau 3 ci-dessous). Les positions des résidus identiques sont indiqués par des astérisques. Le signe \*1 indique le résidu histidine qui semble être critique pour l'activité de l'endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase selon Tomme et al., 1991.

La figure 3 représente une comparaison de séquence en acides aminés entre des EST de riz et la KOR. La séquence soulignée correspond au domaine transmembranaire prédit selon Von Heyne. Les séquences partielles d'ADNc de riz (D46633 et D40576) sont hautement similaires à la KOR : 82 % sur 76 acides aminés pour D46633 et 73 % pour 64 acides aminés pour D40576.



La figure 4 représente une comparaison de séquence en acides aminés de 200 premiers acides aminés de la KOR avec la séquence en acides aminés prédite de deux EST de riz. Les oligos 1 et 2 (SEQ ID n° 3 et 4 respectivement) correspondent à des séquences hautement conservées entre des cellulases de dicotylédone et monocotylédone et peuvent être utilisés pour amplifier des KOR orthologues à partir d'autres espèces de plantes supérieures.

La figure 5 représente la construction d'ADN p35S2-ROK utilisé pour l'inhibition par voie anti-sens de l'expression de la KOR chez *Arabidopsis* transgène.

La figure 6 représente la construction d'ADN p35S2-KOR utilisé pour l'inhibition ou co-suppression de l'expression de la KOR chez *Arabidopsis* transgène. Elle illustre la stratégie de clonage de l'ADNc de *Korrigan* sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur de CaMV.

La présente invention ne se limite pas à la description ci-dessus. Elle sera mieux comprise à la lumière des exemples suivants qui ne sont donnés qu'à titre purement illustratif.

### **Exemple 1 : Inhibition de l'élongation cellulaire chez des plantes d'*Arabidopsis*, mutant pour le gène de la KOR.**

#### **1.1 Phénotype du Mutant**

Les plantes d'*Arabidopsis* (écotype Wassilevskja) homozygote pour la mutation *kor* ont les caractéristiques suivantes : l'hypocotyle de jeunes plantes ayant poussé dans l'obscurité est 4 fois plus petit que celui du type sauvage, ceci étant le résultat d'une longueur cellulaire réduite (Tableau 1 ci-dessous). L'hypocotyle ayant effectué une croissance à la lumière est seulement légèrement plus court que celui du type sauvage. La taille de tous les autres organes est également réduite, y compris les racines, les tiges, les feuilles de la rosette et les feuilles caulines, les organes de fleurs, les siliques, etc... Le mutant *kor* est pleinement fertile.

Tableau 1

Longueur de l'hypocotyle de plantes de 7 jours de type sauvage et du mutant *kor*

Longueur de l'hypocotyle	Jeunes plantes	
	de type sauvage	du mutant <i>kor</i>
Obscurité	1,78+/-0,040	0,506+/-0,007
Lumière	0,49+/-0,009	0,38 +/-0,006

Des hormones de plantes sont connues pour influencer l'élongation cellulaire. Les hormones telles que GA4+7, IAA et Brassinostéroïdes stimulent tandis que l'éthylène, les cytokinines et ABA inhibent la croissance. Le phénotype sauvage ne peut être restauré chez le mutant avec l'une quelconque des hormones testées ou au moyen d'inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène telle que la L- $\alpha$ -2 (Acide 2 aminoéthoxyVinylque)-glycine (AVG, données non montrées). La mutation est récessive nucléaire (Tableau 2 ci-dessous).

Tableau 2

Analyse de la ségrégation du mutant *kor*

N° de graines	Jeunes plantes de type sauvage		Jeunes plantes du mutant <i>kor</i>		X <sup>2</sup> <sub>hi</sub> <sup>a</sup>
	Nombre attendu	Nombre observé	Nombre attendu	Nombre observé	
1522	1142	1136	380	386	0,12

<sup>a</sup> Les valeurs calculées sont basées sur un rapport attendu d'une jeune plante mutante pour 3 jeunes plantes de type sauvage.

### 1.2 Clonage du gène de la *KOR*

Le gène de la *KOR* a été cloné à partir du mutant étiqueté par un ADN-T selon la procédure suivante. L'analyse de la ségrégation a confirmé une liaison étroite entre l'insertion du ADN-T et de l'allèle mutant (634 plantes mutantes testées). L'analyse par Southern blot a révélé la présence d'une insertion unique d'ADN-T. Une séquence voisine a été obtenue par IPCR utilisant la méthode décrite par Lindsey et al., 1996. Le fragment voisin a été utilisé comme une sonde pour cribler une banque génomique d'*Arabidopsis* produite par John Mulligan et distribuée par le EEC-BRIDGE *Arabidopsis* DNA Stock Center et une banque d'ADNc (D'allessio et al., 1992). Un clone d'ADNc "pleine longueur" a été obtenu : PZL-KOR. Les séquences de l'ADNc obtenu et de la protéine prédite sont montrées dans SEQ ID n° 1 et SEQ ID n° 2. Une analyse par Northern blot a été effectuée avec 8 µg d'ARN total de jeunes plants de 7 jours de phénotype sauvage cultivés à la lumière, de feuilles, de tiges, de fleurs, de siliques, de racines, de jeunes plants de 7 jours de phénotype *Korrigan* cultivés à la lumière et des organes entiers de plantes adultes de phénotype *Korrigan* hybridé avec un fragment PstI-PstI de 765bp (entre les positions 114-879). Une bande de 2 kb correspond au transcrit KORRIGAN qui est hautement exprimé dans les tiges et les racines de type sauvage. Le transcrit KORRIGAN est aussi détecté chez les plants de phénotype *Korrigan* mais son expression est considérablement réduite.

Un fragment d'ADN de 8,5 kb dont on présume qu'il contient le gène entier de *kor* a été introduit dans le vecteur de ADN-T binaire pBIB-HYG (Becker, 1990) contenant un marqueur de résistance à l'hygromycine. Le ADN-T a été transformé chez les plantes homozygotes pour *kor* par un protocole d'infiltration décrit par Bechtold et al., 1993. Tous les transformants obtenus résistant à l'hygromycine étaient du type sauvage indiquant que le fragment d'ADN transformé a complété la mutation *kor*.

### 1.3 Comparaisons de séquence

La séquence d'ADNc a été comparée avec des bases de données publiques utilisant les programmes BLASTX et TBLASTN (Altschul et al., 1990) ceci a donné lieu à un grand nombre de résultats hautement significatifs avec des membres de la famille du gène de l'endo-1,4-β-D-glucanase. Parmi cette famille, 100 % d'identité de séquence

a été observé avec la séquence U37702 d'*Arabidopsis* et 74 % avec la séquence I55990 de tomate (demande de brevet US 5 554 743). Ces trois membres de la famille sont clairement distincts du reste de la famille de gène tel montré par l'arbre phylogénique (Tableau 3 ci-dessous et Figure 1).

5

**Tableau 3**  
**Famille E d'endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases**

10	Espèces	Enzyme	Abréviation	Référence ou n° d'accès
	<u>Sous-groupe E1</u>			
	Bactérie			
	<i>Clostridium thermocellum</i>	CelD	CthCelD	Joliff, 1996
15	<u>Sous-groupe E2</u>			
	Bactérie			
	<i>Clostridium stercorarium</i>	CelZ	CstCelZ	Jauris, 1990
	Plante			
20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cel1	ATCel1	U17888
		Cel2	KORRIGAN	U37702
	<i>Capsicum annum</i>	CX1	PepperCX1	Ferrarese, 1995
		CX2	PepperCX2	Ferrarese, 1995
		CX3	Pepper CX3	Ferrarese, 1995
25	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Cel1	TomCel1	Lashbrook, 1994
		Cel2	TomCel2	Lashbrook, 1994
			TomI55990	Bennet, 1996
	<i>Oriza sativa</i>	Cel1D46633	RiceD46633	D46633
		Cel1D40076	RiceD40076	D40076
30	<i>Persea americana</i>	Cel1	AvoCel1	Tucker, 1991
		Cel2	AvoCel2	Cass, 1990
	<i>Pisum sativum</i>	EGL1	EGL1	Wu, 196
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	BAC1	BAC1	Tucker, 1991
	<i>Populus albas</i>	Cel1	Poplar	Nakamura, 1995
35	<i>Sambucus nigra</i>	Cel1	Sambucus	Taylor, 1994

#### 1.4 KOR est liée à la membrane

La traduction conceptuelle de la séquence d'ADN n'a pas révélé la présence d'une séquence de peptide signal potentielle telle que celle trouvée dans la plupart des autres membres de la famille. Au contraire, une séquence de 16 acides aminés hydrophobes ayant une forte probabilité de constituer un signal d'ancrage dans la membrane (selon les prédictions de Von Heyne et al., 1986 et Klein et al., 1985) est observée.

La localisation membranaire de la protéine KOR a été confirmée en faisant produire des anticorps polyclonaux par un lapin contre les 72 acides aminés N-terminaux de KOR fusionnés au C-terminus de la protéine Glutathion-S-Transferase de *Schistosoma japonicum* produite dans E-coli à l'aide du vecteur pGEX-2T'6 (Pharmacia, Upsala, Suède). La protéine fusion a été purifiée à l'aide de glutathion-sépharose selon les instructions du fournisseur. Une fraction microsomale, préparée à partir de feuilles de la plante sauvage, selon la méthode décrite par Höfte et al. 1992, lavée avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH11, contenait une protéine de la taille attendue (70 kDa) réagissant spécifiquement avec l'anti-KOR antiserum, cette protéine était absente dans le mutant. Ces résultats confirment que KOR est une protéine membranaire intrinsèque, ce qui la distingue, outre la séquence, des autres membres de la famille des endo-1,4-β-D-glucanases.

#### 1.5 La KOR code pour une activité endo-1,4-β-D-glucanase

La comparaison de la séquence avec tous les membres connus d'autres familles de cellulase à partir de bactéries (Fig. 2) indique que les résidus montrés comme étant critiques pour une activité enzymatique sont conservés, ceci suggérant que la KOR est une endo-1,4-β-D-glucanase *bona fide*.

En conclusion, ces données démontrent que la KOR code pour une protéine membranaire de la famille des endo-1,4-β-D-glucanases et que son inactivation par mutation résulte en une réduction de la taille cellulaire de tous les organes d'*Arabidopsis*.

#### Exemple 2. Procédé pour l'isolement de KOR orthologues dans n'importe quelle espèce de plante supérieure

Les comparaisons de la séquence de la KOR avec des séquences de protéines partiellement déduites issues du riz (*Oryza sativa*) et de la tomate (*Lycopersicon*

*esculentum*) indiquent une forte conservation de séquences de la protéine (Fig.1 et 3). De façon intéressante, la région N-terminale contenant le domaine transmembranaire prédit, qui est absent dans toutes les isoformes solubles, est également hautement conservé dans les séquences d'*Arabidopsis* et celles de riz.

- 5 C'est à la base de la comparaison entre ces deux dernières séquences, que des amorces pour PCR peuvent être déterminées pour amplifier les orthologues de la KOR dans toutes les espèces de plantes supérieures testées (Fig. 4). Ceci a été démontré avec l'amplification par PCR, chez des espèces de monocotylédones et de dicotylédones, de fragments correspondant aux orthologues de la KOR tels que révélés par la séquence.
- 10 Des méthodes alternatives pour l'isolement des orthologues de la KOR sont des hybridations à faible stringence utilisant le fragment *Bgl*III-*Bgl*III de 273 bp (entre les positions 6 et 279 de la SEQ ID N° 2).

**Exemple 3. Construction pour l'inhibition par anti-sens de l'expression de la KOR chez *Arabidopsis***

- 15 Le plasmide pKYLX71-35S2 (Maiti et al., 1993) a été digéré avec *Hind*III. Les extrémités 5' dépassantes ont été complétées en utilisant le fragment de Klenow de l'ADN PolI et l'ADN a été redigéré avec *Xho*I.

- Le clone pZL1 d'ADNc a été digéré avec *Xba*I, les extrémités 5' dépassantes ont été complétées avec le fragment de Klenow et l'ADN a été redigéré avec *Sa*I. Le
- 20 fragment de 2,3 kb contenant le gène de la KOR a été ligaturé entre le site *Xho*I et le site *Hind*III du vecteur pKYLX71-35S2. De cette façon, l'ADNc de la KOR a été inséré dans une orientation anti-sens derrière le promoteur 35S2. La terminaison 3' de transcription et un signal de poly-adenylation sont fournis par le fragment 3'RbcS présent dans le vecteur.

- 25 **Exemple 4. Transformation d'*Arabidopsis* avec la construction anti-sens de la KOR**

- La construction p35S2-ROK a été introduite dans la souche C58C1 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al., 1986) par électroporation et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu contenant de la Tétracycline telle que décrit par Olszewski et al., 1988. Un transformant *Agrobacterium* obtenu a été utilisé
- 30 pour transformer *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) utilisant la méthode d'infiltration décrite par Bechtold et al., 1993.

**Exemple 5. Construction pour la sur-expression et/ou la sous-expression par co-suppression de KOR dans *Arabidopsis***

Le plasmide pZL1-KOR (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University) contient l'ADNc entier de KOR cloné dans le vecteur pZiplox (D'Alession et al., 1992). Un site EcoRI a été introduit à l'extrémité 3' de la séquence codante de la manière suivante : une réaction PCR est effectuée à partir du plasmide pZL1-KOR avec les oligonucléotides suivants :

5'-CGGAATTCAAGGTTTCCATGGTGCTGGTGG-3', (SEQ ID n° 5) et  
5'-TTTGGATCGTGCGGCTCTTTCA-3' (SEQ ID n° 6)

Le fragment de 1140 pb obtenu est ensuite digéré par les enzymes PstI et EcoRI puis cloné dans le vecteur pLBR19 (Martin-Tanguy, J. et al., 1993), donnant naissance au vecteur pKOR1a. En parallèle, le plasmide pZL1-KOR a été digéré par Sall et XbaI et le fragment d'ADNc "pleine longueur" de KOR a été cloné dans le vecteur pLBR19, donnant lieu à pKOR2. pKOR1a a ensuite été digéré par KpnI et XbaI et le fragment transféré dans pBinplus (Van Engelen et al., 1995), donnant lieu à pKORBin1. Ensuite pKORBin1 et pKOR2 sont digérés avec KpnI et le fragment de pKOR2 contenant le promoteur 35S2 et le début de l'ADNc KOR a été cloné dans pKORBin1, donnant lieu à p35S2-KOR. De cette façon, l'ADNc de la KOR a été inséré dans une orientation sens derrière le promoteur 35S2. La terminaison de transcription en 3' et le signal de polyadénylation sont fournis par le fragment 3' du CaMV présent dans le vecteur.

**Exemple 6. Transformation d'*Arabidopsis* avec la construction p35S2-KOR**

La construction p35S2-KOR a été introduite dans la souche C58C1 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al., 1986) par électroporation et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu contenant de la Tétracycline telle que décrit par Olszewski et al., 1988. Un transformant *Agrobacterium* obtenu a été utilisé pour transformer des plantes du type sauvage d'*Arabidopsis thaliana* (ecotype WS) utilisant la méthode d'infiltration décrite par Bechtold et al., 1993. Des transformants primaires, sélectionnés *in vitro* sur 50 mg/l de kanamycine ont été obtenus. Les plantules présentaient des phénotypes très variables allant d'un phénotype identique à celui du type sauvage, jusqu'à des plantes présentant une très forte inhibition de l'élongation cellulaire dans l'hypocotyl ainsi que dans la racine, les cotylédones et les feuilles. L'inhibition de

l'élongation cellulaire dans ces plantes est très probablement due à l'extinction de l'expression du gène KOR par le phénomène de la co-suppression.



REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local  
5 alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene  
transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. C.R. Acad. Sci. Paris 316,  
1194-1199.
- 10 Becker, D. (1990). Binary vector which allow the exchange of plant selectable markers  
and reporter genes. Nucleic Acids Research 18, 203.
- Bennet, A. B., Fischer, R. L., Lashbrook, C. and Giovannoni, J. (1996). Endo1,4-beta-  
15 glucanase genes and their use in plants. Patent:US 5554743-A
- Brummel, D. A., Lashbrook, C. C. and Bennett, A. B. "Plant endo-1,4-Dglucanases.  
Structure, properties and physiological function." In Enzymatic conversion of biomass for  
fuels production in edited by M. E. Himmel, J. O. Baker and R. P. Overend, American  
20 Chemical Society Year.
- Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in  
flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the  
walls during growth. The Plant Journal 3, 1-30.
- 25 Cass, L. G., Kirven, K. A. and Christoffersen, R. E. (1990). Isolation and characterization  
of a cellulase gene family member expressed during avocado fruit ripening. Molecular  
Gene Genetic 223, 76-86.
- 30 Cosgrove, D. J. (1996). Plant cell enlargement and the action of expansins. Bioessays 18,  
533-540.

- D'Alessio. (1992). Automatic subcloning of cDNA. Focus 14, 76-79.
- Del Campillo, E. and Bennett, A. B. (1996). Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. Plant Physiol. 111, 813-820.
- 5 Desilva, J., Arrowsmith, D., Hellyer, A., Whiteman, S. and Robinson, S. (1994). Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. Journal of Experimental Botany 45, 1693-1701.
- 10 Ferrarese, L., Trainotti, L., Moretto, P., Polverino de laureto, P., Rascio, N. and Casadoro, G. (1995). Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. Plant Molecular Biology 29, 735-747.
- 15 Fry, S. C. (1989). Cellulases, hemicellulose and auxin-stimulated growth: a possible relationship. Physiologia plantarum 75, 532-536.
- Gonzales-Bosch, C., Brummel, D. A. and Bennett, A. B. (1996). Differential Expression of two endo-1,4-beta-glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. Plant Physiol. 111, 1313-1319.
- 20 Höfte et al. (1992), Plant. Physiol., 99, 561-570.
- Inouhe, M. and Nevins, D. J. (1991). Inhibition of auxins-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases. Plant Physiol. 96, 426-431.
- 25 Jauris, S., Rücknagel, K. P., Schwarz, W. H., Kratzsch, P., Bronnenmeir, K. and Staudenbauer, W. L. (1990). Sequence analysis of the Clostridium stercorarium celZ gene encoding a thermoactive cellulase (Avicelase I): identification of catalytic and cellulose-binding domains. Mol Gen Genet 223, 258-267.
- 30

- Joliff, G., Beguin, P. and Aubert, J. P. (1986). Nucleotide sequence of the cellulase gene *celD* encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. Nucl.Acids.Res. 14, 8605-8613.
- 5 Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 204, 383-396.
- Lashbrook, C. C., Gonzalez-Bosch, C. and Benett, A. B. (1994). Two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising  
10 flowers. The Plant Cell 6, 1485-1493.
- Lashbrook, C.C., Giovannoni, J.J., Hall, B.D., Fisher, R.L. and Bennet, A.B. (1998) Transgenic analysis of tomato endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene function. Role of *cel1* in floral  
15 abscission. Plant J. 13, 303-310.
- Lindsey, K. and Topping, J. F. (1996). T-DNA-mediated insertional mutagenesis. In Plant gene isolation. Principles and practice (ed. G. D. Foster and D. Twell), 275-300. Wiley.
- 20 Maiti, I. B., Murphy, J. F., Shaw, J. G. and Hunt, A. G. (1993). Plants that express a potyvirus VPg-proteinase gene are resistant to virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6110-6114.
- Martin-Tanguy, J., Corbineau, F., Burtin, D., Ben-Hayyim, G. , Tepfer, D. (1993).  
25 Genetic transformation with a derivative of *rolC* from *Agrobacterium rhizogenes* ... Plant Science 93, 63-76.
- Meyer and Saedler (1996). Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 23-48.
- 30 Nakamura, S., Mori, H., Sakai, F. and Hayashi, T. (1995). Cloning and sequencing of a cDNA for poplar endo-1,4-beta-glucanase. Plant Cell Physiol. 36, 1229-1235.

- Olszewski, N. E., Martin, F. B. and Ausubel, F. M. (1988). Specialized binary vector for plant transformation: expression of the *Arabidopsis thaliana* AHA gene in *Nicotiana tabacum*. *Nucl. Acids Res* 16, 10765-10782.
- 5 Taylor, J. E., Coupe, S. A., Picton, S. and Roberts, J. A. (1994). Characterization and accumulation pattern of an mRNA encoding an abscission-related beta-1,4-glucanase from leaflets of *Sambucus nigra*. *Plant Mol. Biol.* 24, 961-964.
- Tomme, P., Chauvaux, S., Béguin, P., Millet, J., Aubert, J.-P. and Claeysens, M. (1991).  
10 Identification of a histidyl residue in the active center of endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *The journal of biological chemistry* 266, 10313-10318.
- Tucker, M. L., Durbin, M. L., Clegg, M. T. and Lewis, L. N. (1987). Avocado cellulase:  
15 nucleotide sequence of putative full-length cDNA clone and evidence for small gene family. *Plant Molecular Biology* 9, 197-203.
- Tucker, M. L. and Milligan, S. B. (1991). Sequence analysis and comparison of avocado  
20 fruit and bean abscission cellulases. *Plant Physiol.* 95, 928-933.
- Van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.-P., Pereira, A. and Stiekema, W.J. (1995). pBINPLUS : an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* 4, 288-290.
- 25 Wu, S.-C., Blumer, J. M., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1996). Characterization of an endo-beta-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls. *Plant Physiol.* 110, 163-170.
- 30

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE  
(INRA)
- (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE CHEZ UNE  
PLANTE PAR L'UTILISATION D'UN GENE D'ENDO-1,4-BETA-D-GLUCANASE.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2257 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Arabidopsis thaliana
- (B) SOUCHE: Wassilevskja
- (F) TYPE DE TISSU: Racines, jeunes plantes étiolées, rosettes, tiges,  
fleurs, siliques

## (vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (A) BIBLIOTHEQUE: Arabidopsis thaliana ABRC, D'Alessio et  
al.Lambda Ziplox / Automatic subcloning of cDNA. Focus 14.76-79, 1992

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: U37702 = Korrigan

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCACGAGATC TGATCCCAA CCTTTGATTC ATTGTTGTTG TTCTCTGCTG CTTTATCAGA	60
GAGCATCATC ATGTACGGAA GAGATCCATG GGGAGGTCCA TTGGAGATAA AACTGCAGA	120
TTCCGCCACC GACGATGATC GTAGTCGGAA TTTAAACGAT TTGGATCGTG CGGCTCTTTC	180
ACGTCCACTA GATGAGACGC AGCAGAGTTG GTTACTTGGT CCAACGGAGC AGAAGAAGAA	240
GAAGTACGTC GATCTCGGTT GTATTATCGT TAGCCGCAAG ATCTTCGTCT GGAAGTTGG	300
TACTCTTGTT GCCGCCGCGT TACTCGCCGG ATTCATTACC TTGATCGTTA AACTGTGCC	360
GCGTCATCAT CCTAAGACTC CGCCGCCGGA TAATTATACT ATAGCTCTAC ACAAAGCTCT	420
TAAGTTCTTC AATGCTCAGA AATCTGGGAA ATTGCCAAAG CATAATAACG TGTCATGGAG	480
AGGTAATTCT GGGCTTCAAG ATGGGAAAGG TGAAACAGGA AGCTTCTATA AAGATTGGT	540
GGGAGGTTAT TATGATGCTG GTGATGCTAT CAAGTTCAAT TTCCCATGG CTTATGCTAT	600
GACTATGTTG AGCTGGAGTG TTATTGAATA TAGTGCTAAA TACGAAGCTG CTGGTGAGCT	660
CACTCATGTT AAGGAGCTTA TCAAATGGGG AACTGATTAC TTTCTCAAGA CTTTCAATAG	720
TACTGCTGAT TCCATTGATG ATCTTGTC ACAGGTTGGA TCAGGGAATA CTGATGATGG	780
AAATACAGAT CCTAATGACC ATTACTGTTG GATGCGACCT GAGGATATGG ACTATAAAG	840
GCCCGTGA CTGTAATG GTGGATGTTT GGATCTCGCT GCAGAGATGG CAGCTGCTCT	900
GGCTTCAGCA TCTATTGTAT TCAAGGATAA CAAGGAATAT TCTAAAAAGC TTGTCCATGG	960
TGCTAAGGTG GTGTATCAGT TTGGAAGGAC GAGGAGAGGG AGATATAGTG CAGGCACTGC	1020
GGAATCTAGC AAGTTCTATA ATTCAAGTAT GTATTGGGAT GAGTTCATTT GGGGTGGTGC	1080
TTGGATGTAT TATGCTACCG GAAATGTAAC GTATCTCAAT CTAATCAGCC AACCTACTAT	1140
GGCCAAGCAT GCTGGTGCCT TCTGGGGTGG CCCTTACTAT GGTGTATTTA GCTGGGACAA	1200
CAAGCTTGCT GGTGCTCAGT TGCTGTTGAG CCGGTTGAGG TTGTTTCTGA GTCCTGGATA	1260
TCCATATGAA GAAATTCTAA GGACCTTCCA CAATCAGACC AGCATAGTCA TGTGCTCATA	1320
CTTGCTTATT TTCAACAAAT TTAACAGAAC CAATGGAGGT TTAATAGAGT TGAATCATGG	1380
AGCTCCACAG CCGCTGCAAT ATTCTGTAAA TGCAGCTTTC TTAGCGACTC TATACAGTGA	1440
TTATCTGGAT GCTGCTGATA CTCCTGGATG GTACTGTGGA CCTAATTTCT ATTCGACAAG	1500
TGTGCTACGT GACTTTGCTA GATCCCAGAT TGATTATATA CTGGGTAAAA ACCCTCGGAA	1560

```

AATGAGTTAT GTCGTTGGTT TTGGCACAAA ATACCCAAGA CATGTGCATC ACAGAGGAGC   1620
TTCGATACCC AAGAACAAAG TCAAGTATAA CTGCAAAGGA GGATGGAAAT GGAGAGACAG   1680
CAAGAAACCA AACCCAAACA CGATTGAAGG AGCCATGGTT GCTGGTCCTG ACAAGCGCGA   1740
CGGGTACCGT GATGTCCGTA TGAACTACAA CTACACTGAA CCGACTCTTG CAGGCAATGC   1800
TGGTCTAGTC GCAGCTCTTG TGGCATTATC GGGTGAAGAA GAAGCCACCG GTAAGATAGA   1860
CAAAAACACT ATTTTCTCAG CTGTTCCCTC TTTGTTCCCT ACTCCACCAC CTCCACCAGC   1920
ACCATGGAAA CCTTGAGAAA GCTAGACTTG TGTGATTCTG TCGCTGCTGC CAAAAAAAT   1980
GAATGAGGTA AGAAGGATTT GGGTGTGAGA CCAGAAGATT AGAAGCTAAA CACAAGTCAG   2040
CCATAACCAA ACTACTAAGG ATTTCATTTG GCTTTACTAG ATACAAACAC GGGGTGGGTT   2100
ACTTTACCAC AAGCATTGTC TTTCTTTTCT TTTTTTGGGT TGCTGTTTGT TTCTTGTGAG   2160
ATATCATATA TATCTATGCG TTTTACTCTG TATATGTTTG ATACCAAAC TGTATTCTTT   2220
GATAACAAT TTAATGAACT GTATTAACT TTTAACT                               2257

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 621 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Arabidopsis thaliana
  - (B) SOUCHE: Columbia
  - (F) TYPE DE TISSU: Racines, jeunes plantes étiolées, rosettes, tiges, fleurs, siliques
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
  - (A) BIBLIOTHEQUE: Arabidopsis thaliana ABRC, D'Alessio et al. Lambda Ziplox / Automatic subcloning of cDNA. Focus 14.76-79, 1992
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
 

Met	Tyr	Gly	Arg	Asp	Pro	Trp	Gly	Gly	Pro	Leu	Glu	Ile	Asn	Thr	Ala
1				5					10					15	
Asp	Ser	Ala	Thr	Asp	Asp	Asp	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Leu	Asp
			20					25						30	

Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp Glu Thr Gln Gln Ser Trp Leu  
 35 40 45  
 Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys Lys Tyr Val Asp Leu Gly Cys  
 50 55 60  
 Ile Ile Val Ser Arg Lys Ile Phe Val Trp Thr Val Gly Thr Leu Val  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile Thr Leu Ile Val Lys Thr Val  
 85 90 95  
 Pro Arg His His Pro Lys Thr Pro Pro Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Ala  
 100 105 110  
 Leu His Lys Ala Leu Lys Phe Phe Asn Ala Gln Lys Ser Gly Lys Leu  
 115 120 125  
 Pro Lys His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gln Asp  
 130 135 140  
 Gly Lys Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr Lys Asp Leu Val Gly Gly Tyr  
 145 150 155 160  
 Tyr Asp Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn Phe Pro Met Ala Tyr Ala  
 165 170 175  
 Met Thr Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser Ala Lys Tyr Glu  
 180 185 190  
 Ala Ala Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys Trp Gly Thr  
 195 200 205  
 Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser Ile Asp Asp  
 210 215 220  
 Leu Val Ser Gln Val Gly Ser Gly Asn Thr Asp Asp Gly Asn Thr Asp  
 225 230 235 240  
 Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met Asp Tyr Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn Gly Gly Cys Ser Asp Leu Ala Ala Glu  
 260 265 270  
 Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val Phe Lys Asp Asn Lys  
 275 280 285  
 Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val His Gly Ala Lys Val Val Tyr Gln Phe  
 290 295 300  
 Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala Glu Ser Ser  
 305 310 315 320



Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met Tyr Trp Asp Glu Phe Ile Trp Gly Gly  
 325 330 335  
 Ala Trp Met Tyr Tyr Ala Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu Asn Leu Ile  
 340 345 350  
 Thr Gln Pro Thr Met Ala Lys His Ala Gly Ala Phe Trp Gly Gly Pro  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly Ala Gln Leu  
 370 375 380  
 Leu Leu Ser Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr Pro Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser Ile Val Met Cys Ser  
 405 410 415  
 Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn Gly Gly Leu Ile  
 420 425 430  
 Glu Leu Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser Val Asn Ala  
 435 440 445  
 Ala Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Asp Ala Ala Asp Thr  
 450 455 460  
 Pro Gly Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr Ser Val Leu Arg  
 465 470 475 480  
 Asp Phe Ala Arg Ser Gln Ile Asp Tyr Ile Leu Gly Lys Asn Pro Arg  
 485 490 495  
 Lys Met Ser Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro Arg His Val  
 500 505 510  
 His His Arg Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys Tyr Asn Cys  
 515 520 525  
 Lys Gly Gly Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys Lys Pro Asn Pro Asn Thr  
 530 535 540  
 Ile Glu Gly Ala Met Val Ala Gly Pro Asp Lys Arg Asp Gly Tyr Arg  
 545 550 555 560  
 Asp Val Arg Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro Thr Leu Ala Gly Asn  
 565 570 575  
 Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu Glu Glu Ala  
 580 585 590  
 Thr Gly Lys Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala Val Pro Pro Leu  
 595 600 605

Phe Pro Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro  
610 615 620

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: oligo 1
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:5
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie A ou T"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:6
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie T ou C"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:9
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:10
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie C ou A"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:12
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie A ou C ou G ou T"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:15
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie T ou C"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
  - (B) EMPLACEMENT:18
  - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATGTNNGGNN GNGANCCNTG GGG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligo 2

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 3
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 6
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 9
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie G ou A"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 12
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie G ou A"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 15
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie G ou A"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 18
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT: 21
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "N signifie inosine"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TCNCCNGCNT CNTANTANCC NCC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGGAATTCAA GGTTCATG GTGCTGGTGG

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TTTGATCGT GCGGCTCTT CA

22

REVENDICATIONS

- 1/ Utilisation d'une séquence nucléotidique comprenant :
- 5 a) une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'une endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase correspondant à la séquence protéique selon SEQ ID N° 2 ou un fragment de SEQ ID n° 2, ou
- b) une séquence nucléotidique comprenant au moins 20 pb et dérivant d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide dont l'extrémité N-terminale présente au moins 40 % et de préférence au moins 70 % d'identité avec les 107 premiers
- 10 acides aminés de SEQ ID N° 2, pour inhiber la croissance cellulaire chez une plante.
- 2/ Utilisation d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique est dans une orientation sens.
- 15 3/ Utilisation d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique est dans une orientation anti-sens.
- 4/ Vecteur dans lequel est insérée une séquence nucléotidique telle que définie dans la
- 20 revendication 2 ou 3.
- 5/ Vecteur selon la revendication 4 apte à transformer directement les cellules de plante.
- 6/ Vecteur selon la revendication 4 apte à transformer un microorganisme, lui-même
- 25 apte à transformer une cellule de plante.
- 7/ Vecteur selon la revendication 6 caractérisé en ce que le microorganisme est *Agrobacterium tumefaciens*.
- 30 8/ Vecteur selon l'une des revendications 4 à 7 caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur spécifique de types cellulaires, tissus ou organes de la plante.

- 9/ Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 4 à 7 pour le criblage de molécules herbicides ou de régulateurs de croissance inhibiteurs de l'activité glucanase.
- 10/ Procédé de contrôle de la croissance cellulaire d'une plante comprenant une étape de transformation directe ou indirecte d'une cellule de plante par un vecteur selon l'une des revendications 4 à 8.
- 11/ Procédé de contrôle de la croissance cellulaire d'une plante selon la revendication 10, caractérisé en ce que le contrôle consiste en une inhibition partielle ou totale de ladite croissance cellulaire.
- 12/ Cellule de plante transformée susceptible d'être obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 10 ou 11.
- 13/ Cellule de plante transformée directement ou indirectement par un vecteur selon l'une des revendications 4 à 8.
- 14/ Plantes comprenant des cellules selon la revendication 12 ou 13.
- 15/ Plantes selon la revendication 14 choisies dans le groupe comprenant les espèces des généra suivants : *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Frifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Mnihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphamus*, *Sinapsis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Licopersicon*, *Nicotinia*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hterocallis*, *Nemesia*, *Perlargonium*, *Panicum*, *Pennisctum*, *Rananculus*, *Senecia*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, *Malus*, *Apium*, *Eucalyptus*, *Populus* et *Datura*.
- 16/ Plantes selon la revendication 15 choisies dans le groupe comprenant *Brassica oleracea*, *Brassica napus* et le colza.
- 17/ Semences-issues de plantes selon l'une des revendications 14 à 16.

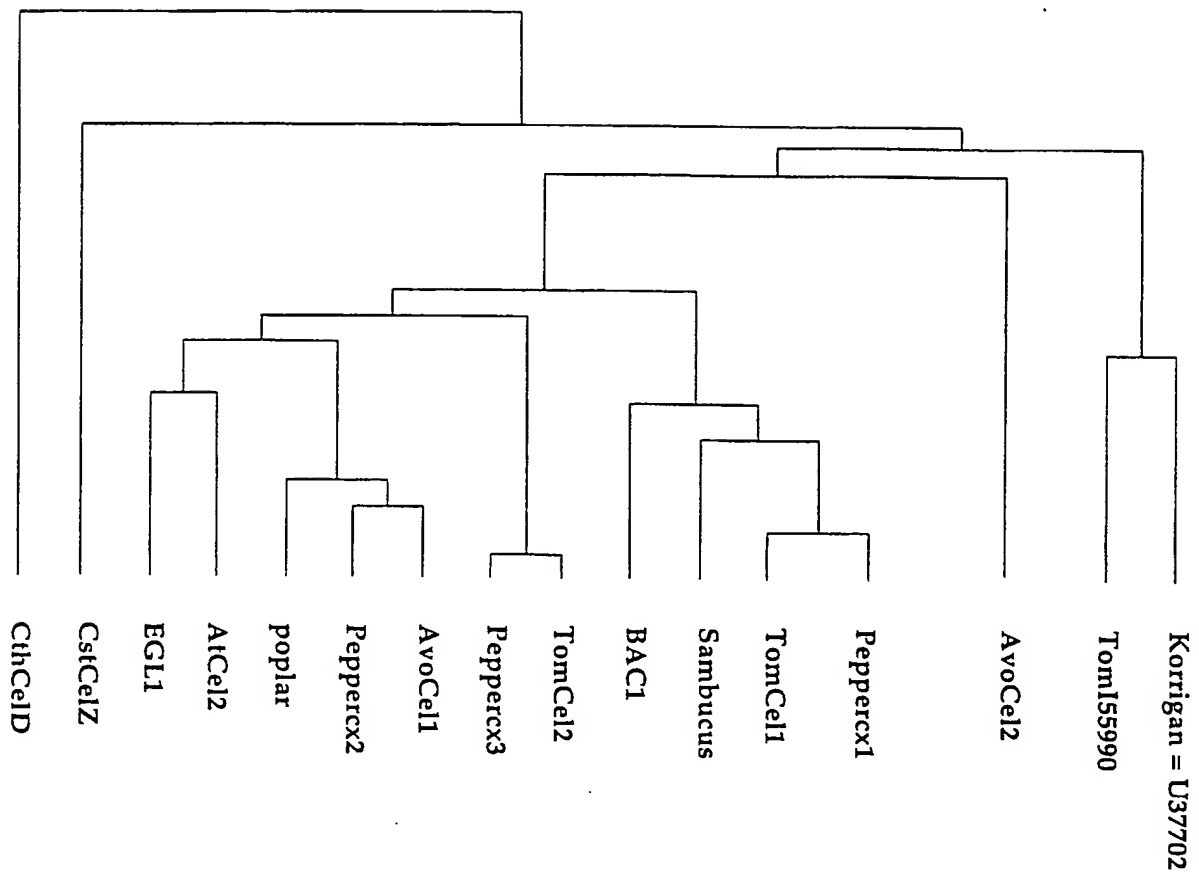


FIGURE 1

2/7

korrigan	GKNPRKMSYV	VGFGTKYPRH	VHHRGASIPK	EPTLAGNA	GLVAALVALS
I55990	GKNPRKISYV	VGFGNHYPKH	VHHRGASIPK	EPTLAGNA	GLVAALVALS
Avocel2	GENPAKMSYM	VGFGERYPQH	VHHRGSSLPS	EPATYINA	PLVGALAFFA
Avocel2p	GENPAKMSYM	VGFGERYPQH	VHHRGSSLPS	EPATYINA	PLVGALAFFA
peppercx1	.....	.....	.....	.....	.....
capsicum	GNNPLQMSYM	VGFGNKYPTQ	LHHRASSLPS	EPTTYMNA	AFVGSVAALI
TomCel1	GNNPLKMSYM	VGFGNKYPTK	LHHRASSLPS	EPTTYMNA	AFIGSVAALI
sambucusnigra	GNNPMKMSYM	VGFGSKYPLQ	LHHRGASIPS	ETTTYMNA	AFVGSVAALV
BAC	GNNPMKMSYM	VGFGSKYPKQ	LHHRGSSIPS	EPTTYINA	AFVASISALL
TomCel2	GDNPQRMSYM	VGYGPHYPQR	IHHRGSSVPS	EPTTYVNA	PLVGLLAYFA
peppercx3	GDNPPQMSYM	V.....	.....	.....	.....
AvoCel1	GQNPAMMSYM	VGFGERYPQH	VHHRGSSLPS	EPATYINA	PLVGALAFFA
peppercx2	.....	.....	.....	.....	.....
poplar	GDNPARMSYM	VGFGNRYPQH	VHHRGSSVPS	EPATYINA	PFVGALAFFS
Atglucanase	GDNPIKMSYM	VGFSNFPKR	IHHISSSLPS	EPATYINA	AFVGPLAYFS
EGL1	GENPLRMSYM	VGYPYFPR	IHHRGSSLPS	EPATYING	AIVGPLAYFS
CstCelZ	GSSG..RSYV	VGFGVNPPKR	PHHRTA....	EVACDYNA	GFVGALAKMY
celD	GRNYYNRSYV	TGLGINPPMN	PHDRRSGADG	EIAINWNA	ALIYALAGFV
	*	*	* <sub>1</sub>	*	*

FIGURE 2



3/7

```

RICEd40576      1 .....
KORRIGAN        1 MGRDPWGGPLEINTADSATDDDRSRNLNLDRAALSRLDETQQS WLLGPT EQ....KK
RICEd46633      1 MGRDPWGGPLEISNADSATDDDRSR...DLDRGGADAA LDETQQS CSWAGPGDQAGKKK

RICEd40576      1 .....
KORRIGAN        57 KKYVDLGCIIIVSRKIFVWTVGTLVAAALLAGFITLIVKTVPRHHPKT PPPDQYTDALHKA
RICEd46633      58 KKYVDLGFMS.....

RICEd40576      14 LLEFFNAQKSGRLPKNNNGIKWRGNSGLSDGSDLT D.VKGGLVGGYYDAGDNIKFH.....
KORRIGAN        117 LKFFNAQKSGKLPKNNNVS WRGNSGLQDGKGETGSFYKDLVGGYYDAGDAIKFNFP MAYA
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        177 MTMLSWSVIEYSAKYEAAAGELTHVKELIKWGT DYFLKTFNSTADSIDDLVSQVSGNTDD
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        237 GNTDPNDHYCWMRPEDMDYKRPVTCNGGCSDLAAEMAAALASASIVFKDNKEYSKKL VH
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        297 GAKVVYQFGRTRRGYSAGTAESSKFYNSSMYWDEFI WGGAWMYATGNVTYLNLIQTPT
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        357 MAKHAGAFWGGPFYGVFSWDNKLAGAQLLLSRLRLFLSPGYPYEEILRTFHNQTSIVMCS
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        417 YLPINFNKFNR TNGGELIENHGAPQLQYSVNA AFLATLYSDYLDAA DTPGWYCGPNFYST
RICEd46633      .....

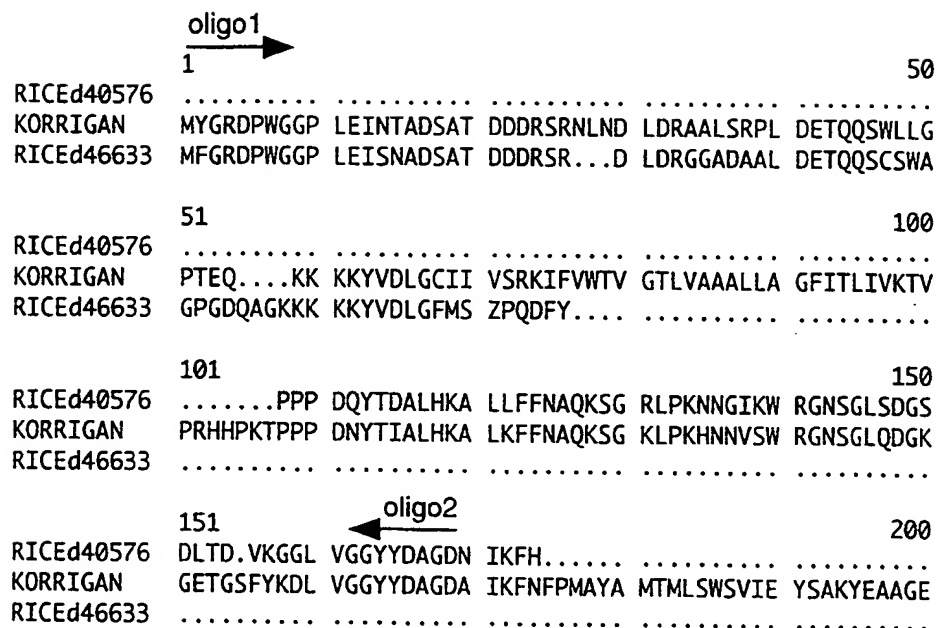
RICEd40576      .....
KORRIGAN        477 SVLRDFARSQIDYILGKNPRKMSYVVGFGTKYPRHVHERGASIPKNKVKNCKGGWKWRD
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        537 SKKPNPNTIEGAMVAGFDKRDGYRDVRMNYNTEPTLAGNAGLVAA LVALSGEEATGKI
RICEd46633      .....

RICEd40576      .....
KORRIGAN        597 DKNTIFS AVFPLFPTEPPPPAPWKP
RICEd46633      .....

```

FIGURE 3



oligo1 : ATGT(AT)(TC)GGI(CA)G(ACGT)GA(TC)CCITGGGG

oligo2 : TC|CC|GC(GA)TC(GA)TA(GA)TA|CC|CC

FIGURE 4

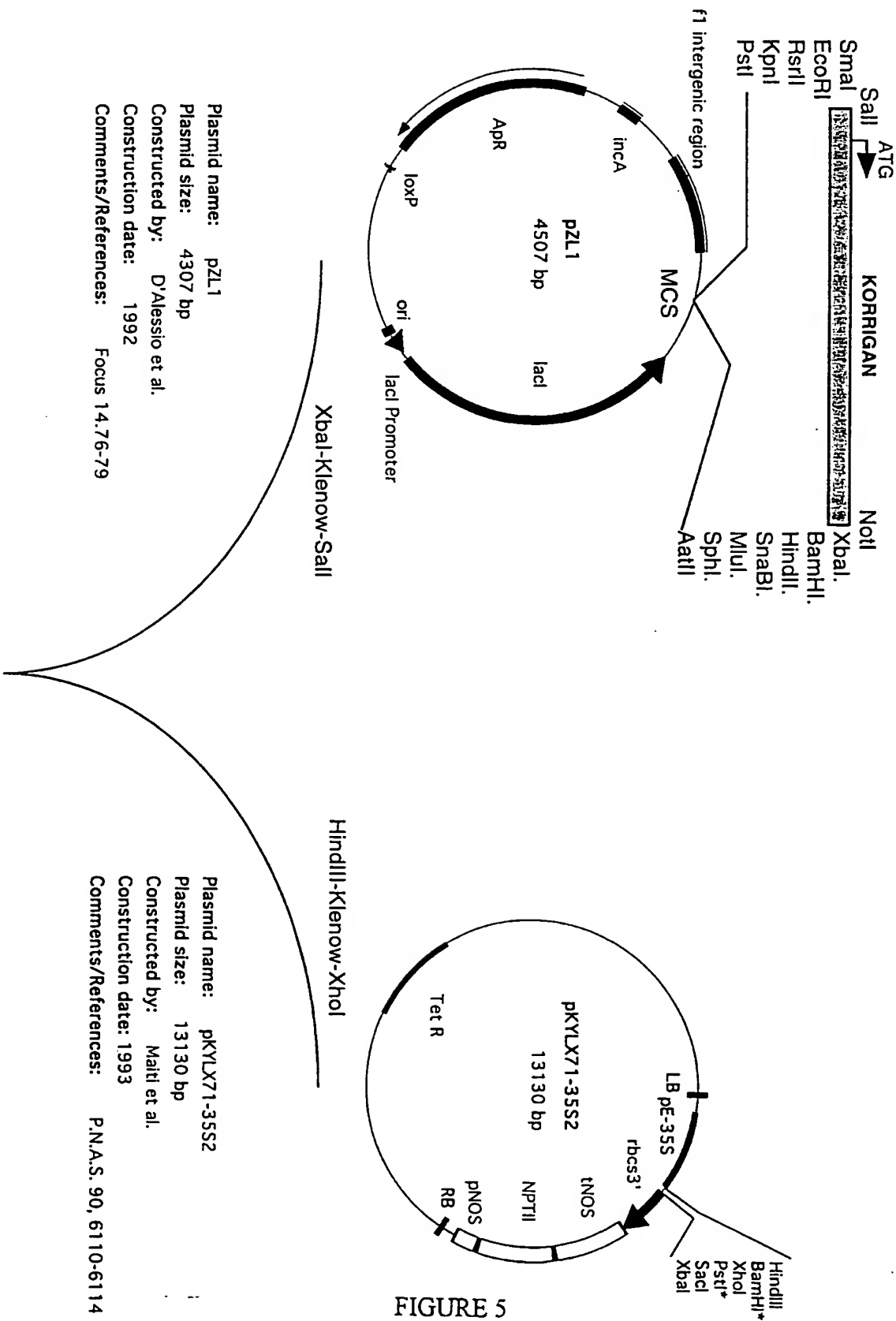


FIGURE 5

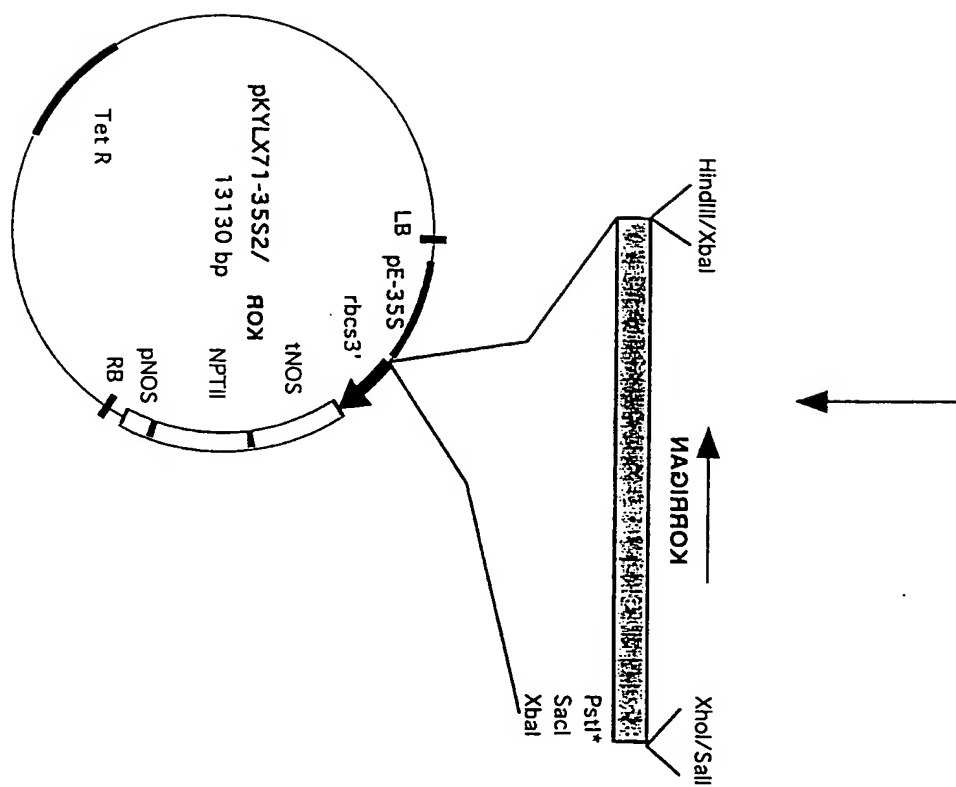


FIGURE 5 (Suite)

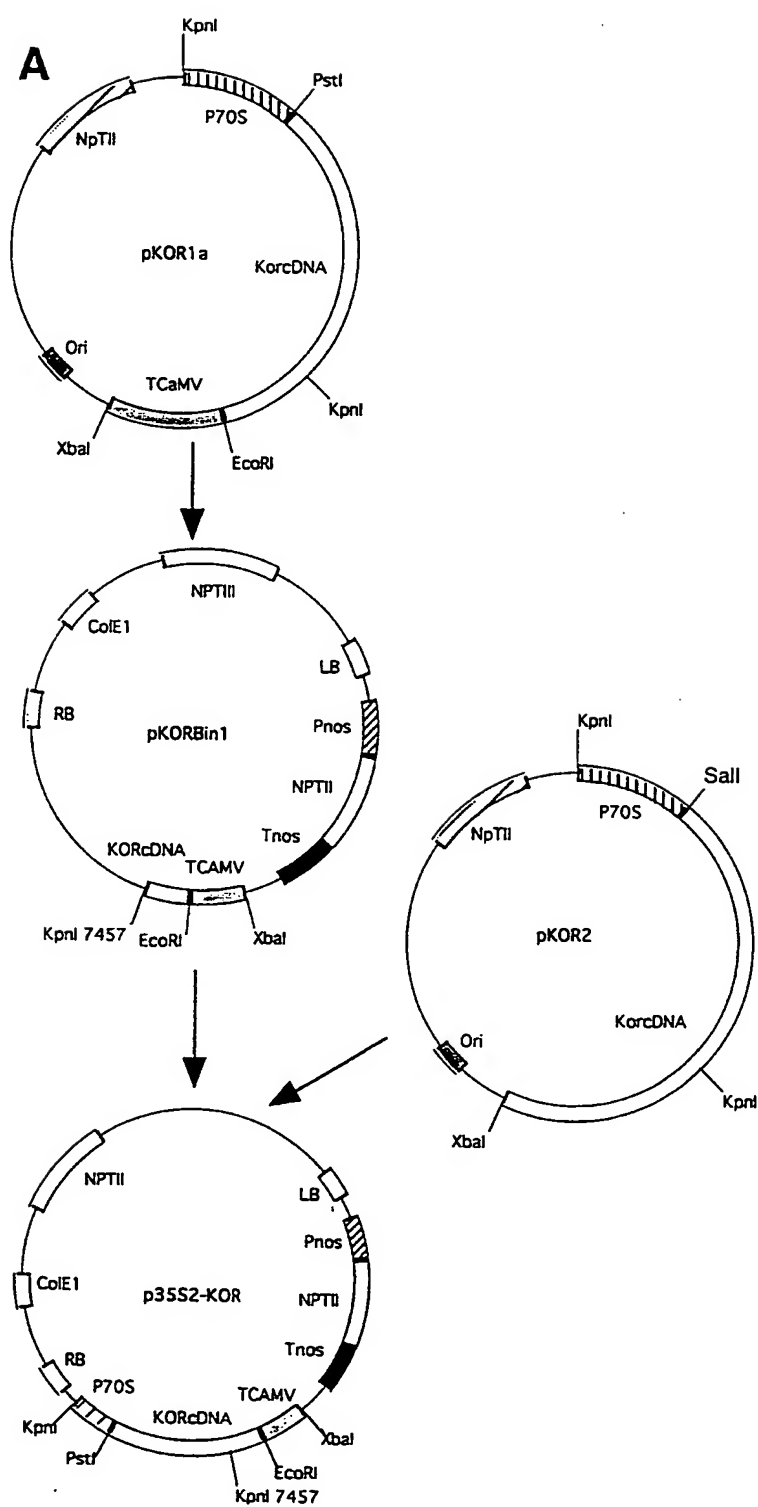


FIGURE 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00928

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/82 C12N15/55 C12N15/11 C12N5/10 A01H5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOEBLER M.: "The OR16 cDNA encodes a protein homologous to cellulase, AC U37702" EMBL DATABASE, 21 October 1995, XP002053808 HEIDELBERG cited in the application see the whole document ---	4-8, 13-17
A	WO 93 17101 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 2 September 1993 see the whole document ---	1-17
A	WO 96 01555 A (UNIV CALIFORNIA) 25 January 1996 cited in the application see the whole document ---	1-17
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">2 September 1998</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14/09/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Kania, T</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00928

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>INOUE M. AND NEVINS D.: "Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases"            PLANT PHYSIOLOGY,            vol. 96, no. 2, June 1991, pages 426-431,            XP002053809            cited in the application            see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
A	<p>WU S. ET AL.: "Characterization of an endo-beta-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls"            PLANT PHYSIOLOGY,            vol. 110, no. 1, January 1996, pages 163-170, XP002053810            cited in the application            see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
A	<p>BRUMMELL D. ET AL.: "Plant endo-1,4-beta-D-glucanases"            ACS SYMPOSIUM SERIES,            vol. 566, 1994, pages 100-129, XP002053811            cited in the application            * pref. p. 116-18 *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
T	<p>SHANI Z. ET AL.: "Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4-beta-glucanase (cell) from Arabidopsis thaliana"            PLANT MOLECULAR BIOLOGY,            vol. 34, no. 6, August 1997, pages 837-842, XP002076142            see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 98/00928

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9317101 A	02-09-1993	AU 3529597 A	20-11-1997
		AU 3572893 A	13-09-1993
		CA 2117608 A	02-09-1993
		EP 0628075 A	14-12-1994
		JP 7508159 T	14-09-1995
		MX 9301120 A	01-09-1993
		US 5767364 A	16-06-1998
		ZA 9301333 A	25-08-1994
WO 9601555 A	25-01-1996	US 5585545 A	17-12-1996
		AU 3005495 A	09-02-1996
		CA 2194388 A	25-01-1996
		EP 0769898 A	02-05-1997
		JP 10504712 T	12-05-1998
		US 5554743 A	10-09-1996



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'ide Internationale No  
PCT/FR 98/00928

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C12N15/55 C12N15/11 C12N5/10 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LOEBLER M.: "The OR16 cDNA encodes a protein homologous to cellulase, AC U37702" EMBL DATABASE, 21 octobre 1995, XP002053808 HEIDELBERG cité dans la demande voir le document en entier ---	4-8, 13-17
A	WO 93 17101 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 2 septembre 1993 voir le document en entier ---	1-17
A	WO 96 01555 A (UNIV CALIFORNIA) 25 janvier 1996 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kania, T

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D .nde Internationale No

PCT/FR 98/00928

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>INOUE M. AND NEVINS D.: "Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases"</p> <p>PLANT PHYSIOLOGY, vol. 96, no. 2, juin 1991, pages 426-431, XP002053809</p> <p>cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-17
A	<p>WU S. ET AL.: "Characterization of an endo-beta-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls"</p> <p>PLANT PHYSIOLOGY, vol. 110, no. 1, janvier 1996, pages 163-170, XP002053810</p> <p>cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-17
A	<p>BRUMMELL D. ET AL.: "Plant endo-1,4-beta-D-glucanases"</p> <p>ACS SYMPOSIUM SERIES, vol. 566, 1994, pages 100-129, XP002053811</p> <p>cité dans la demande * pref. p. 116-18 *</p> <p>---</p>	1-17
T	<p>SHANI Z. ET AL.: "Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4-beta-glucanase (cell) from Arabidopsis thaliana"</p> <p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 34, no. 6, août 1997, pages 837-842, XP002076142</p> <p>voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-17

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

C .de Internationale No

PCT/FR 98/00928

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9317101 A	02-09-1993	AU 3529597 A	20-11-1997
		AU 3572893 A	13-09-1993
		CA 2117608 A	02-09-1993
		EP 0628075 A	14-12-1994
		JP 7508159 T	14-09-1995
		MX 9301120 A	01-09-1993
		US 5767364 A	16-06-1998
		ZA 9301333 A	25-08-1994
WO 9601555 A	25-01-1996	US 5585545 A	17-12-1996
		AU 3005495 A	09-02-1996
		CA 2194388 A	25-01-1996
		EP 0769898 A	02-05-1997
		JP 10504712 T	12-05-1998
		US 5554743 A	10-09-1996